

Express Mail No. EV934844535US

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Mai 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/040364 A1

- | | | |
|---|---|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : | C12N 15/10 | [DE/DE]; Schleifersberg 13, 42697 Solingen (DE). WE-
BER, Martin [DE/DE]; Fliedeweg 26, 42799 Leichlingen
(DE). |
| (21) Internationales Aktenzeichen: | PCT/EP02/12384 | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: | 6. November 2002 (06.11.2002) | (74) Gemeinsamer Vertreter: QIAGEN GMBH ;
Max-Volmer-Strasse 4, 40724 Hilden (DE). |
| (25) Einreichungssprache: | Deutsch | (81) Bestimmungsstaaten (<i>national</i>): JP, US. |
| (26) Veröffentlichungssprache: | Deutsch | (84) Bestimmungsstaaten (<i>regional</i>): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR). |
| (30) Angaben zur Priorität: | 101 53 957.6 6. November 2001 (06.11.2001) DE | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4,
40724 Hilden (DE). | | Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen. |
| (72) Erfinder; und | | |
| (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SINGER, Thorsten | | |



WO 03/040364 A1

(54) Title: METHOD FOR THE ISOLATION OF NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSAUREN

(57) Abstract: The invention relates to a simplified and rapid method for the isolation of nucleic acids, in particular plasmid DNA from *E. coli*, whereby after alkaline lysis of the sample, the above is neutralised with a salt of a carboxylic acid and the resulting mixture then brought into contact with a silica matrix in the presence of an alcohol.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein vereinfachtes und schnelles Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere Plasmid DNA aus *E. coli*, bei dem nach alkalischer Lyse der Probe diese mit einem Salz einer Carbonsäure neutralisiert wird und die resultierende Mischung anschliessend mit einer Silica-Matrix in Gegenwart eines Alkohols in kontakt gebracht wird.

Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren

Die vorliegende Erfindung betrifft ein vereinfachtes und schnelles Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren insbesondere Plasmid DNA aus E. coli.

Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus komplexen Ausgangsmaterialien sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt und beinhalten im ersten Schritt die Lyse des biologischen Materials unter Verwendung eines Detergenz. Dabei wird dieser erste Schritt in Gegenwart von Enzymen durchgeführt, die für den Proteinabbau erforderlich sind.

In einem zweiten Schritt folgt im allgemeinen eine Extraktion der Nukleinsäuren mit geeigneten organischen Lösungsmitteln – wie z.B. Phenol und/oder Chloroform. Diesem Schritt folgt im allgemeinen eine Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol und die Dialyse der Nukleinsäuren. – So ist aus dem Stand der Technik u.a. ein Verfahren bekannt, in dem Plasmid-DNA verschiedenen Extraktions- und Detergens-Behandlungen unterzogen wird, um die Zellen zu lysieren, aus denen dann die Plasmid-Nukleinsäure erhalten wird und um Zellbestandteile und auch anderes Nukleinsäurematerial zu entfernen. Die reine Plasmid-DNA wird in einem abschließenden Schritt an Glaspulver in Abwesenheit einer chaotropen Substanz gebunden [M.A. Marko et al., Analytical Biochemistry 121, 382-387, 1982].

Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren – wie z.B. die Isolierung von doppelsträngiger DNA - sind allerdings sehr arbeits- und zeitaufwendig. Die verhältnismäßig große Anzahl von Schritten, die erforderlich sind, um Nukleinsäuren aus derartigen Ausgangsmaterialien zu isolieren, vergrößern das Risiko der Kontamination bei der gleichzeitigen Bearbeitung verschiedener Proben. – Dieser Sachverhalt stellt insbesondere bei der Bearbeitung von klinischem Probenmaterial ein kaum kalkulierbares Risiko dar. Wenn die Nukleinsäure für einen anschließenden Nachweis auf Anwesenheit von Nukleinsäure, z.B. eines Krankheitserregers (z.B. ein Virus oder eines Bakteriums) mit dem Nukleinsäureamplifikationsverfahren, zum Beispiel mittels Polymerase-Kettenreaktion [PCR, Saiki et al., Science 230, 1985 1350] isoliert werden soll, dann ist dieses Risiko einer Kontamination mit fremder Nukleinsäure auf gar keinen Fall tolerierbar.

Des weiteren sind alternative Verfahren aus dem Stand der Technik bekannt, die jedoch ebenfalls mit dem Risiko der Probenkontamination behaftet sind.

So ist aus dem Stand der Technik ein Verfahren zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellkulturen bekannt [Analytical Biochemistry 162, 1987, 156]. Gemäß diesem Verfahren wird die RNA in einer einzigen Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Mischung dem biologischen Ausgangsmaterial entzogen. Nach der Phasentrennung kann die RNA in einem brauchbaren Zustand innerhalb von 4 Stunden durch weiteres Verarbeiten der wässrigen Phase gewonnen werden.

Des weiteren ist aus dem Stand der Technik ein Verfahren zur Isolierung von DNA aus Geweben und Zelllinien beschrieben, bei dem die Zellen in einem Guanidinium-HCl enthaltendem Puffer dispergiert und in Ethanol gefällt werden [Analytical Biochemistry 162, 1987, 463]. Von diesem Verfahren ist bekannt, dass es für Kontaminationen anfällig ist, jedoch kann ein brauchbares NA-Produkt innerhalb weniger Stunden nach Bearbeitung der abgetrennten DNA isoliert werden.

Speziell im Hinblick auf Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels einer Plasmid-Matrix kann festgehalten werden, dass derartige Verfahren meist auf einer alkalischen Lyse basieren (Resuspension, alkalische Lyse, Neutralisation), wobei der Neutralisationspuffer chaotrope Salze zur Einstellung der Bedingungen zur Bindung der DNA an die Silica-Matrix enthält. Der Nachteil dieser aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren wird durch einen voluminösen Niederschlag verkörpert, der zur Folge hat, dass das Lysat in einem weiteren sehr zeitaufwendigen Schritt (z.B. Zentrifugation oder Filtration) geklärt werden muss, bevor es mit der Matrix in Kontakt gebracht werden kann.

Das so geklärte Lysat wird dann in eine Säule überführt und dann unter Anlegen eines Vakuums oder auf dem Wege der Zentrifugation durch die Silica-Membran prozessiert.

Zur Abtrennung von Verunreinigungen wird die Membran mit einem alkoholhaltigen Puffer gewaschen und im Rahmen einer daran anschließenden Zentrifugations-/Vakuumbehandlung von Alkoholresten befreit. Zuletzt wird die Nukleinsäure (DNA) mit einem sog. Niedrigsalzpuffer (z.B. 10 mM Tris-HCl , pH 8,5) eluiert.

Das grundlegende Prinzip dieser Verfahrensweise wird u.a. in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 90 200 678.2 bzw. von R. Boom et. al. [R. Boom et al. J. Clin. Microbiol, 28 (3) (1990) 495] offenbart.

Die vorliegende Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zu überwinden und insbesondere ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das ohne die zeitaufwendige Klärung des Lysats auskommt.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das weitestgehend ohne Substanzen auskommt, die als „reizend“ oder gar als gesundheitsschädlich angesehen werden.

Erfindungsgemäß werden diese Aufgaben dadurch gelöst, dass man nach der an sich bekannten alkalischen Lyse mit einem dafür aus dem Stand der Technik bekannten Puffer (z.B. 200 mM NaOH, 1% SDS) für den nachfolgenden Neutralisierungsschritt einen Neutralisierungspuffer auf der Basis eines Salzes einer Carbonsäure verwendet.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass sich durch die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auch die Ausbeute gegenüber den entsprechenden - aus dem Stand der Technik bekannten - Verfahren erhöhen lässt

Als Carbonsäuren im Sinne der Erfindung werden zunächst gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren, vorzugsweise C₁-C₆-Alkylcarbonsäuren verstanden, worunter Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure, n-Valeriansäure, Isovaleriansäure, Ethyl-methyl-essigsäure (2-Methylbuttersäure), 2,2-Dimethylpropionsäure (Pivalinsäure), n-Hexansäure bevorzugt werden. Besonders bevorzugt werden Salze der Ameisensäure und/oder der Essigsäure eingesetzt.

Als ungesättigte Alkenyl-carbonsäuren im Sinne der Erfindung seien beispielsweise Acrylsäure (Propensäure), Methacrylsäure, Crotonsäure, *iso*-Crotonsäure sowie Vinyllessigsäure genannt.

WO 03/040364

PCT/EP02/12384

4

Daneben können gesättigte aliphatische C₂-C₆-Dicarbonsäuren, wie zum Beispiel Oxalsäure, Malonsäure, Bersteinsäure, Glutarsäure und/oder Adipinsäure eingesetzt werden.

Zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgaben eignen sich daneben aliphatische Hydroxi-di- und -tricarbonsäuren, worunter (2R, 3R)-(+)-Weinsäure, (2S, 3S)-(-)-Weinsäure, oder meso-Weinsäure bevorzugt werden.

Erfindungsgemäß werden insbesondere Salze der Alkalimetalle, Ammoniumsalze bzw. Salze oder quartärer Amine eingesetzt.

Besonders bevorzugt finden Lithium- oder Natrium- oder Ammoniumsalze (NH₄⁺) Verwendung.

Daneben können Mischungen der beschriebenen Salze eingesetzt werden.

Durch den Einsatz von wässrigen Lösungen dieser Salze wird erfindungsgemäß eine Eintrübung des Lysats vermieden, womit sich der nachfolgende Klärungsschritt erübrigt.

Beispielhaft läuft das erfindungsgemäße Verfahren für die Isolierung von DNA – aus *E. coli* – wie folgt ab:

Das aus der Bakterienkultur gewonnene Pellet wird zunächst in einem geeigneten Puffer resuspendiert. Derartige Puffer sind aus dem Stand der Technik bekannt und auch kommerziell erhältlich. Ein geeigneter Puffer besteht aus einer wässrigen Lösung mit 50 mM Tris sowie 10 mM EDTA (pH 8,8). Der angegebene Puffer ist geeignet, um Bakterien zu resuspendieren – es ist jedoch auch der Einsatz jedweder anderen Salze, bzw. Puffersysteme, die im Bereich eines physiologischen pH-Wertes puffern, möglich.

Auch die für die anschließende Lyse einsetzbaren Puffer sind aus dem Stand der Technik bekannt und kommerziell erhältlich. Ein geeigneter Puffer besteht aus einer 200 mM Natriumhydroxid-Lösung enthaltend 1% SDS – auch in diesem Fall ist der

Einsatz anderer handelsüblicher Puffer, die ggf. andere Detergenzien enthalten – wie z.B. Triton – möglich.

Nach der Lyse über einen ausreichend langen Zeitraum erfolgt erfindungsgemäß die Zugabe einer wässrigen Lösung eines Acetatsalzes, wie z.B. einer 3 M wässrigen Ammoniumacetatlösung (pH 5,5). Hierbei ist auch der Einsatz von derivatisierten Acetaten – wie z.B. halogensubstituierter Acetate - möglich.

Nach der Zugabe Alkohols, vorzugsweise eines verzweigen oder unverzweigten C₁ – C₃ – Alkohols, besonders bevorzugt *iso*-Propanol wird die so erhaltene Mischung mit einer Silica-Matrix in Kontakt gebracht, wobei die DNA quantitativ gebunden werden kann.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eignen sich daneben auch andere alkoholische Hydroxigruppen aufweisende Verbindungen, wie z.B. Polyethylenglykole. Bevorzugt werden dabei Polyethylenglykole mit einem Molekulargewicht in einem Bereich von 2000 bis 10000, besonders bevorzugt mit einem Molekulargewicht in einem Bereich von 4000 bis 8000 eingesetzt.

Die Abtrennung der Proteine erfolgt bei der Verwendung einer Silica-Membran als Matrix dadurch, dass der Anteil der in Lösung befindlichen Proteine nicht an die Silica-Matrix bindet, während ausgefällte Proteine irreversibel denaturiert sind und Proteine durch den Filtrationseffekt bei der Passage durch die Membran zurückgehalten wird.

Nach dem Durchleiten des Rohlysats durch die Silica-Matrix, wird – beispielsweise – die Membran mit einem Waschpuffer gewaschen.

Geeignete Waschpuffer sind ebenfalls aus dem Stand der Technik bekannt und kommerziell erhältlich. Die Anforderung die an geeignete Puffer zu stellen sind, bestehen lediglich darin, dass der Puffer gewährleisten muss, dass die Nukleinsäure nicht von der Matrix abgelöst wird. Allgemein genügt ein hoher Alkoholgehalt und optional leicht alkalischer pH, um die Autoproteolyse der DNA zu verhindern. Auch Puffer, die chaotrope Verbindungen enthalten - wie z.B. PB (QIAGEN GmbH, Hilden, Bundesrepublik Deutschland) - sind geeignet, solange sie die oben erwähnten Bedingungen erfüllen.

Nach dem Entfernen der Pufferrückstände – z.B. auf dem Wege der Zentrifugation erfolgt letztendlich die Elution der Nukleinsäure mittels eines geeigneten Elutionspuffer. Auch diese Elutionspuffer sind aus dem Stand der Technik in hinreichender Weise bekannt sowie kommerziell erhältlich. Bevorzugt werden Puffer mit niedriger Salzkonzentration oder auch Wasser.

Erläuterung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt das der densitometrischen Bestimmung zugrundeliegende Agarose-Gel aus Beispiel 2.

Fig. 2 zeigt das der densitometrischen Bestimmung zugrundeliegende Agarose-Gel aus Beispiel 3 - es wurden jeweils gleiche Volumina der jeweiligen Präparation 1 aufgetragen.

Fig. 3 zeigt das der densitometrischen Bestimmung zugrundeliegende Agarose-Gel aus Beispiel 4.

Fig. 4 zeigt die den densitometrischen Ausbeutebestimmungen zugrunde liegenden Agarose-Gele aus Beispiel 8.

Reihenfolge der Proben (v.l.n.r.):	Erfindungsgemäßes Verfahren - 96-1 BR 3000
	Erfindungsgemäßes Verfahren - 96-2 BR 3000
	Stand der Technik (QIAprep Turbo 96) BR 3000
	Erfindungsgemäßes Verfahren - 96-1 manuell
	leer
	Erfindungsgemäßes Verfahren - 96-2 manuell

Die Randbezeichnungen geben die Position der aufgetragenen Proben im 96 well Block entsprechend dem SBS-Standard an.

Die Gele zeigen für alle Präparationsmethoden gleichwertige Ergebnisse. Die Ausfälle der wells G5 und H5 liegen in der Heterogenität der aufgearbeiteten Genbank begründet und sind unabhängig von der angewendeten Präparationsmethode.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung verdeutlichen:

Vorbemerkungen:

Die angeführten Beispiele wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. Etwaige Abweichung sind gesondert angeführt.

Protokoll zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Minimaßstab:
für 1,5 ml *E. coli* Kultur

- (1) Bakterienpellet in 150 µl Resuspensionspuffer resuspendieren
- (2) Zugabe von 150 µl Lysepuffer und vorsichtig mischen. Ca. 3 Minuten lysieren
- (3) Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer und gut durchmischen (nicht vortexen!)
- (4) Zugabe von 300 µl Isopropanol und gut durchmischen (nicht vortexen!)
- (5) Rohlysate über eine Silicamembran-Säule geben und 1 min bei 14 000 Upm zentrifugieren.
- (6) Waschen durch Zugabe von 750 µl 80 Vol.-proz. wässriges Ethanol sowie 10 mM Tris und 1 min bei 14 000 Upm zentrifugieren
- (7) Zum Entfernen von Pufferresten noch einmal 1 min bei 14 000 Upm zentrifugieren
- (8) Elution mit 200 µl 10 mM Tris-Lösung (pH 8,5). Auf die Membran pipettieren, 1 min stehenlassen und durchzentrifugieren (1 min bei 14 000 Upm)

Durch das Wegfallen des Lysatklärungs-schrittes verkürzt sich die Präparationszeit um 10 min auf die Hälfte der Zeit.

Bei den aufgeführten Beispielen wurden Referenz-Präparationen mit QIAprep als repräsentatives Beispiel für eine handelsübliche Silica-Methode mit einem chaotropen Bindepuffer durchgeführt. Die Referenz ist in den angeführten Beispielen durch „QIAprep“ gekennzeichnet. (Bei der QIAprep-Methode wird aus einem zuvor geklärten Lysat die DNA in Gegenwart chaotroper Salze, die in hoher Konzentration zugegen sind, an eine Silica-Membran gebunden und nach einem Reinigungsschritt von der

WO 03/040364

8

PCT/EP02/12384

Membran eluiert. Entsprechende Kits sind von der Fa. QIAGEN GmbH, Hilden, Bundesrepublik Deutschland, kommerziell erhältlich).

Beispiel 1: Vergleich von 3 M NH_4OAc , pH 5,5 gegenüber 3 M LiOAc ($\text{Ac} = \text{COCH}_3$), pH 5,5 als Neutralisationspuffer; Einfluß des Kations.

Als Referenz wurde eine parallel eine Plasmid-Isolierung mit QIAprep durchgeführt.

DH5 α /pCMV β (High-Copy):

Verwendete Neutralisationspuffer
(Schritt 3 im oben angegebenen
Protokoll):

OD₂₆₀ [μg]:

	3 M Li^+	3 M NH_4^+	QIAprep
1	11,1	12,4	18,1
2	10,8	10,5	16,8
3	11,8	11,2	17,2
X	11,2	11,4	17,4

3 M Li^+ 3 M Li-Acetat, pH 5,5
3 M NH_4^+ 3 M NH_4^+ -Acetat, pH 5,5

Densitometrische Bestimmung [μg]:

	3 M Li^+	3 M NH_4^+	QIAprep
1	11,6	14,0	14,4
2	12,0	11,7	15,7
3	11,6	10,2	15,6
X	11,7	12,0	15,2

Die Ergebnisse zeigen, dass bei High-Copy-Plasmiden mit beiden Neutralisationspuffern eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Quantifizierungsmethoden erreicht wird. D.h.: es wird weitgehend nur Plasmid-DNA isoliert.

DH5 α /pBRCMV β (Low-Copy):

OD₂₆₀ [μg]:

	3 M Li^+	3 M NH_4^+	QIAprep
1	5,1	3,6	3,8
2	11,5	3,4	3,5
3	17,5	4,0	3,1
X	11,4	3,7	3,5

WO 03/040364

9

PCT/EP02/12384

	3 M Li ⁺	3 M NH ₄ ⁺	QIAprep
1	0,7	1,8	2,7
2	0,9	2,0	3,0
3	0,4	2,1	2,7
X	0,7	2,0	2,8

Im Unterschied zu den High-Copy-Plasmiden zeigen die Low-Copy-Präparationen deutliche Unterschiede zwischen der Neutralisation mit Li- bzw. NH₄-Acetat. Eine gute Übereinstimmung beider Meßmethoden wird nur bei Neutralisation mit Ammonium-acetat, erreicht. Dieser Sachverhalt liefert einen Beleg dafür, dass das System damit wesentlich robuster wird und daher für den allgemeinen Einsatz besonders geeignet ist.

Beispiel 2: Vergleich von 3 M NH₄OAc, pH 5,5 gegenüber anderen Ammoniumsalz-lösungen als Neutralisationspuffer; Einfluß des Anions.

Ausbeuten [µg] nach OD₂₆₀:

Anion Konz.	Formlat		HPO ₄ ²⁻		SO ₄ ²⁻		Tartrat	H ₂ PO ₄ ⁻
	1 M	3 M	1 M	3 M	1 M	3 M	1 M	1M
1	3,3	4,7	2,3	3,3	2,1	3,0	2,8	2,5
2	2,4	4,0	2,4	3,6	2,5	2,3	2,1	2,3
X	2,9	4,4	2,4	3,5	2,3	2,7	2,5	2,4

X = Mittelwert

Ausbeuten [µg] nach Densitometrie:

Anion Konz.	Formlat		HPO ₄ ²⁻		SO ₄ ²⁻		Tartrat	H ₂ PO ₄ ⁻
	1 M	3 M	1 M	3 M	1 M	3 M	1 M	1M
1	1,3	4,8	1,8	1,0	1,8	0	2,8	0,6
2	0,8	4,5	1,3	1,4	2,1	0	1,7	0,3
X	1,1	4,7	1,6	1,2	2,0	0	2,3	0,5

X = Mittelwert

Die Referenzausbeuten mit 3 M NH₄OAc, pH 5,5 wurden als 0% Fehlquantifizierung gesetzt und lagen im Mittel 5,2 µg (zwei separat angesetzte Pufferchargen, jeweils als Doppelbestimmung).

Die oben wiedergegebenen Ergebnisse belegen den Einfluss des Anions sowohl im Hinblick auf die Gesamtausbeuten, als auch bei der Reduzierung der photometrischen Überquantifizierung.

Beispiel 3: Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens (DirectPrep) für die Isolierung verschiedener Konstrukte aus verschiedenen Stämmen von *E. coli*.

Hierfür wurden vier typische Laborstämme ausgewählt und daraus Plasmide verschiedener Kopienzahl und unterschiedlicher Größen isoliert.

Erfindungsgemäßes Verfahren:

Plasmid	Größe [kb]	Stamm	OD ₆₀₀	1	2	3	X
Cosmid 9 (Low-Copy)	40	DH5α	2,8	10	8,3	7,4	8,6
		HB101	3,2	8,1	9,1	9,2	8,8
pBRCMVβ (Low-Copy)	6,8	DH5α	3,4	7	4,8	4,9	5,6
		HB101	3,4	5,9	4,1	5,6	5,2
		TOP10F'	2,5	2,6	2,7	2,5	2,6
		XL1blue	3,5	5,5	5,4	5,7	5,5
pCMVβ (High-Copy)	7,2	DH5α	2,3	12,1	10,2	11,8	11,4
		HB101	2,6	8,2	9,9	8,3	8,8
		TOP10F'	2,7	9,5	11,3	10,8	10,5
		XL1blue	2,1	10,8	11,9	11,8	11,5
pTS64 (High-Copy)	11,5	DH5α	2,1	9,9	9,3	9,9	9,7
		XL1blue	2,4	5,1	14,8	20,6	13,5
pUC21 (High-Copy)	3,2	DH5α	2,8	4,6	4,5	4,7	4,6
		HB101	3,2	4,8	5,5	4,1	4,8
		TOP10F'	2,1	3,4	3,8	3,7	3,6
		XL1blue	1,9	4,1	4	4,4	4,2

WO 03/040364

11

PCT/EP02/12384

Verfahren aus dem Stand der Technik (QIAprep):

Plasmid	Größe [kb]	Stamm	OD ₆₀₀	1	2	3	X
Cosmid 9 (Low-Copy)	40	DH5α	2,8	10,9	10,8	9,8	10,5
		HB101	3,2	11,3	5,2	11,5	9,3
pBRCMVβ (Low-Copy)	6,8	DH5α	3,4	4,1	4,2	4,7	4,3
		HB101	3,4	6	9,2	8,6	7,9
		TOP10F'	2,5	3,8	3,7	3,8	3,8
		XL1blue	3,5	5,7	5,7	4,8	5,4
pCMVβ (High-Copy)	7,2	DH5α	2,3	14,7	13,6	14,2	14,2
		HB101	2,6	10,3	10,6	9,9	10,3
		TOP10F'	2,7	18,9	18,7	18,1	18,6
		XL1blue	2,1	15,9	14,5	13,9	14,8
pTS64 (High-Copy)	11,5	DH5α	2,1	14,1	13,4	14,1	13,9
		XL1blue	2,4	24,6	28,1	23,5	25,4
pUC21 (High-Copy)	3,2	DH5α	2,8	5,6	5,6	5,6	5,6
		HB101	3,2	4,1	4,8	4,7	4,5
		TOP10F'	2,1	5,1	5,2	5	5,1
		XL1blue	1,9	6,4	5,8	5,7	6,0

Zur Bestimmung einer der Überquantifizierung wurden alle QIAprep-Werte auf 100% gesetzt, d.h. eine völlige Übereinstimmung zwischen OD₂₆₀ und densitometrischer Bestimmung vorausgesetzt. Damit wurden die folgenden relativen Werte für die Schnellpräparation erhalten:

Plasmid	Größe [kb]	Stamm	OD ₆₀₀	Densitometrie
Cosmid 9 (Low-Copy)	40	DH5α	82	99
		HB101	94	93
pBRCMVβ (Low-Copy)	6,8	DH5α	128	86
		HB101	66	120
		TOP10F'	69	82
		XL1blue	102	90

WO 03/040364

12

PCT/EP02/12384

pCMVβ (High-Copy)	7,2	DH5α	80	119
		HB101	86	93
		TOP10F'	57	77
		XL1blue	78	75
pTS64 (High-Copy)	11,5	DH5α	70	100
		XL1blue	53	64
pUC21 (High-Copy)	3,2	DH5α	82	111
		HB101	106	130
		TOP10F'	71	101
		XL1blue	70	94
Mittelwerte:			80	97

Im Mittel wurde eine Ausbeute von 80% der Ausbeuten der QIAprep-Präparationen nach OD₂₆₀ und nahezu 100% nach densitometrischer Auswertung erhalten.

Das Beispiel zeigt, dass das beschriebene neue Verfahren allgemein anwendbar ist und nahezu identische Ergebnisse im Vergleich zu bereits im Stand der Technik etablierten Methoden liefert.

Die Agarose-Gele zeigen außerdem einen weiteren Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens: die DNA zeigte deutlich geringere Scherung der Plasmide, als bei den bisherigen Verfahren und liegt zu nahezu 100% als „supercoiled“ Form vor.

Beispiel 4: Stabilität und Qualität der isolierten Plasmid-DNA

Es wurde in einer Dreifachbestimmung je ein High- und Low-Copy-Plasmid isoliert und 20 h bei 37°C in Gegenwart eines DNase-Reaktionspuffers (Die Zusammensetzung derartiger Puffer ist aus dem Stand der Technik - wie z.B. aus molekularbiologischen Standardwerken - bekannt) inkubiert.

Dabei konnte kein Unterschied zwischen inkubierter und nicht-inkubierter Plasmid-DNA beobachtet werden, was die Abwesenheit von DNasen in der Präparation belegt.

Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierte DNA frei von kontaminierenden DNasen ist und die Lagerungsstabilität den etablierten Silica-Verfahren mit Lysatklärung und chaotroper Bindechemie gleichwertig. (Referenz für eine etablierte Präparationsmethode: QIAprep, Fa. QIAGEN). Im Unterschied zu dem etablierten Verfahren zeigt die nach dem neuen Verfahren isolierte DNA einen weit höheren Anteil an intakter „supercoiled“ Form.

Testsequenzierungen ergaben identische Leseweiten für Plasmid-DNA, die nach dem neuen Verfahren und dem QIAprep-Verfahren isoliert wurde.

Beispiel 5: Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Isopropanol zur Bindung

Es wurden je 1,5 ml DH5 α /pBRCMV β (Low-Copy) aufgearbeitet und ansteigende Mengen Isopropanol zur Bindung der Plasmid-DNA eingesetzt.

Ausbeuten [μ g] nach OD₂₆₀:

Vol % Isoprop.	28,6	33,3	37,5	41,2	44,4	47,4	50
1	2,2	2,6	2,8	2,9	4,1	5,5	14,1
2	3,8	2,2	2,7	3,1	6,0	9,3	18,2
3	2,5	2,6	2,4	3,5	5,4	7,0	13,7
Mittelwert	2,8	2,5	2,6	3,2	5,2	7,3	15,3

Ausbeuten [μ g] nach Densitometrie:

Vol % Isoprop.	28,6	33,3	37,5	41,2	44,4	47,4	50
1	1,1	2,6	2,8	2,9	2,8	2,1	4,3
2	2,7	1,8	3,2	2,9	3,9	3,8	4,0
3	2,4	2,9	2,4	2,6	3,1	3,3	3,6
Mittelwert	2,1	2,4	2,8	2,8	3,3	3,1	4,0

Beim Vergleich der man die erhaltenen Werte der photometrischen und densitometrischen Analyse, ist eine allmähliche Steigerung der Ausbeute bei zunehmendem Isopropanolanteil zu beobachten. Gleichzeitig fällt auf, dass diese Steigerung bei der photometrischen Messung sehr viel stärker ausfällt, als bei der Densitometrie. Da die densitometrische Bestimmung lediglich die enthaltene Plasmid-DNA erfasst, die photometrische Analyse dagegen die Gesamtheit aller Nukleinsäuren, zeigt die zunehmende Diskrepanz zwischen OD-Bestimmung und Densitometrie bei höheren Isopropanolmengen einen höheren Grad an Verunreinigung. Die im Verfahren gewählten standardmäßig verwendeten 41,2 Vol% liefern einen Beleg für eine sehr gute Übereinstimmung beider Meßmethode bei größerer Gesamtausbeute im Vergleich zu den Ansätzen mit niedrigeren Alkoholmengen. Das zeigt, dass die so isolierte Plasmid-DNA einen geringeren Anteil an anderen kontaminierenden Nukleinsäuren enthält.

Beispiel 6: Einfluss des verwendeten Alkohols

Es wurden je 1,5 ml DH5 α /pCMV β (Fa. Clontech) (High-Copy) aufgearbeitet und C₁-C₄-Alkohole auf ihre Eignung zur Bindung von Plasmid-DNA getestet. Alle Angaben in μ g.

Ausbeute OD₂₆₀

Alkohol	Isoprop	EtOH	MeOH	1-ButOH	1-ButOH	2-ButOH	2-ButOH	QIAprep
Vol %	37,5	50	50	50	33,3	50	33,3	-
1	10,5	10,0	7,7	2,1	5,9	2,4	5,4	11,3
2	9,2	11,0	6,7	4,5	3,6	3,4	3,8	11,0
X	9,9	10,5	7,2	3,3	4,8	2,9	4,6	11,1

Ausbeute Densitometrie

Alkohol	Isoprop	EtOH	MeOH	1-ButOH	1-ButOH	2-ButOH	2-ButOH	QIAprep
Vol %	37,5	50	50	50	33,3	50	33,3	-
1	11,7	11,4	3,6	0,4	1,0	0,3	2,0	9,0
2	10,0	11,8	4,5	0,7	0,6	1,2	1,6	9,1
X	10,8	11,6	4,0	0,6	0,8	0,8	1,8	9,0

WO 03/040364

15

PCT/EP02/12384

OD-Überquantifizierung [%]

Alkohol	Isoprop	EtOH	MeOH	1-ButOH	1-ButOH	2-ButOH	2-ButOH	QIAprep
Vol %	37,5	50	50	50	33,3	50	33,3	-
1	90	88	214	488	583	713	270	126
2	92	94	150	652	587	287	246	121
X	91	91	178	588	584	381	259	124

Isoprop	Isopropanol
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
1-ButOH	Butan-1-ol
2-ButOH	Butan-2-ol

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass *iso*-Propanol und Ethanol, sowie auch Methanol zur selektiven Bindung von Plasmid-DNA an die Silica-Matrix für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind.

Beispiel 7: Verwendung von Polyethylenglykolen zur Einstellung der Bindebedingungen

Es wurden je 1,5 ml DH5 α /pCMV β (Fa. Clontech) (High-Copy) aufgearbeitet und Polyethylenglykole verschiedener Molekulargewichte auf ihre Eignung zur Bindung von Plasmid-DNA getestet. Es wurden, entsprechend dem eingangs beschriebenen Protokoll je 300 μ l einer 40% (w/v) Lösung eingesetzt (alle Angaben in μ g).

Ausbeute OD₂₆₀

PEG	4000	6000	8000
1	4,6	3,5	5,7
2	4,6	5,1	5,3
X	4,6	4,3	5,5

Ausbeute Densitometer

PEG	4000	6000	8000
1	4,4	2,3	2,8
2	4,0	4,1	5,0
X	4,2	3,2	3,9

X = Mittelwert

PEG = Polyethylenglykol

4000, 6000, 8000 = mittleres Molekulargewicht der Polyethylenglykole

Die experimentellen Befunde belegen, dass sich ebenfalls auch Polyethylenglykole verschiedener Molekulargewichte eignen sich sehr gut zur Einstellung der Bindebedingungen im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die dabei erreichten Ausbeuten, sowie die Übereinstimmungen von photometrischer und densitometrischer Quantifizierung sind vergleichbar zu den z.B. mit *iso*-Propanol erreichten Ergebnissen.

Beispiel 8: Anwendung des beschriebenen Verfahrens im Hochdurchsatzbereich

Es wurden je 1,25 ml DH10B/pUC19-Genbank (high-copy) in einem 96well Block angezogen und entsprechend dem unter „Vorbemerkungen“ angegebenen Protokoll aufgearbeitet. Zur Bindung der DNA wurde eine 96well Platte mit geeigneter Membrankombination verwendet. Das Verfahren wurde manuell, sowie auf einem BIOROBOT (Fa. QIAGEN) durchgeführt.

Als Referenz wurde mit dem QIAprep Turbo System (QIAGEN GmbH, Hilden, Bundesrepublik Deutschland) eine schon lange auf dem Markt befindliche Methode gewählt.

Alle Angaben in µg. Ausbeuten sind jeweils über alle 96 Proben gemittelt.

WO 03/040364

17

PCT/EP02/12384

Ausbeute Densitometer

manuell	erfindungsgemäßes Verfahren 96	4,3
	Verfahren aus dem Stand der Technik (QIAprep Turbo 96)	6,0

Ausbeute Densitometer

BR3000	erfindungsgemäßes Verfahren 96	3,0
	Verfahren aus dem Stand der Technik (QIAprep Turbo 96)	2,8

BR3000 ... BIORobot 3000 (QIAGEN GmbH, Hilden, Bundesrepublik Deutschland)

Zur Überprüfung der Qualität der isolierten DNA wurden jeweils 24 der 96 Proben sequenziert und einer Phred20-Analyse unterzogen, die eine Aussage über die erhaltenen Leselängen und damit die Qualität erlaubt.

Stand der Technik (QIAprep Turbo): 524 Basenpaare
erfindungsgemäßes Verfahren: 505 Basenpaare

Unter Berücksichtigung der üblichen Schwankungen bei der Isolierung aus biologischen Systemen, zeigt sich das erfindungsgemäße Verfahren den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren in punkto Ausbeute und Qualität durchaus ebenbürtig. Das Wegfallen des Lysatklärungsschrittes erlaubt jedoch im Gegensatz zum Stand der Technik eine einfache gleichzeitige Aufarbeitung von 96 Klonen pro Platte. Daher ist das erfindungsgemäße Verfahren für den Hochdurchsatzbereich – manuell und vollautomatisiert – besonders geeignet.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls eine Formulierung bzw. ein Kit zur Durchführung eines der anspruchsgemäßen Verfahren, insbesondere ein Kit enthaltend das Alkali- – insbesondere Lithium oder Natrium – oder Ammoniumsalz einer aliphatischen Carbonsäure – bevorzugt Ameisen- oder Essigsäure – ggf. in wässriger Lösung; einen aliphatischen Alkohol, insbesondere *iso*-Propanol und/oder Polyethylenglykol(e) mit einem Molekulargewicht in einem Bereich von 2.000 bis 10.000; ggf. einen Waschpuffer und einen Elutionspuffer.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass man eine die Nukleinsäure enthaltende biologische Probe auf an sich bekannte Weise einer alkalischen Lyse unterwirft und die daraus resultierende Reaktionsmischung mit einem Salz einer Carbonsäure neutralisiert und die Nukleinsäure anschließend in Gegenwart eines Alkohols mit einer Silica-Matrix in Kontakt bringt, die and die Matrix gebundene Nukleinsäure isoliert und ggf. mit einem Waschpuffer wäscht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz einer gesättigten aliphatischen Monocarbonsäure einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz einer C₁-C₆-Alkylcarbonsäure einsetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz der Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure, n-Valeriansäure, Isovaleriansäure, Ethylmethyl-essigsäure (2-Methylbuttersäure), 2,2-Dimethylpropionsäure (Pivalinsäure), und/oder n-Hexansäure einsetzt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Salz einer Carbonsäure dasjenige einer ungesättigten Alkenyl-carbonsäure einsetzt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz der Acrylsäure (Propensäure), Methacrylsäure, Crotonsäure, *iso*-Crotonsäure und/oder Vinylessigsäure einsetzt
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz einer Carbonsäure das Salz einer gesättigten aliphatischen C₂-C₆-Dicarbonsäure einsetzt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Salz einer gesättigten aliphatischen C₂-C₆-Dicarbonsäure das Salz der Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure und/oder Adipinsäure einsetzt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz einer Carbonsäure das Salz einer aliphatischen Hydroxi-di- und -tricarbonsäure einsetzt.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz einer Carbonsäure als Salz einer aliphatischen Hydroxi-di-carbonsäure (2R, 3R)-(+)-Weinsäure, (2S, 3S)-(-)-Weinsäure und/oder *meso*-Weinsäure einsetzt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man das Salz einer Carbonsäure – vorzugsweise das Formiat oder Acetat - mit einem Alkalimetall einsetzt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Lithiumacetat oder Natriumacetat einsetzt.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Ammoniumacetat einsetzt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man das Carbonsäuresalz ggf. zusammen mit anderen Hilfsstoffen in Form einer wässrigen Lösung einsetzt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die finale Konzentration des Carbonsäuresalzes im einem Intervall von 0.1 bis 5 M liegt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die finale Konzentration Carbonsäuresalzes im einem Intervall von 0.3 bis 2 M liegt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Carbonsäuresalz in der wässrigen Lösung final in 0.3 M Konzentration vorliegt.

18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das aus der Neutralisierung resultierende Reaktionsgemisch mit in Gegenwart eines verzweigten oder unverzweigten C₁-C₃-Alkohols mit einer Silica-Matrix in Kontakt gebracht wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol Ethanol ist.
20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol *iso*-Propanol (Propan-2-ol) ist.
21. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zum Einstellen der Bindebedingungen ein Polyethylenglykol einsetzt.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das mittlere Molekulargewicht der eingesetzten Polyethylenglykole in einem Intervall von 1.000 bis 12.000 liegt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das mittlere Molekulargewicht der eingesetzten Polyethylenglykole in einem Intervall von 2.000 bis 10.000 liegt.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das mittlere Molekulargewicht der eingesetzten Polyethylenglykole in einem Intervall von 4.000 bis 8.000 liegt.
25. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Elutionspuffer Wasser ist.
26. Verwendung von Carbonsäuresalzen oder Mischungen von Carbonsäuresalzen ggf. neben weiteren Hilfsstoffen zur Neutralisation von Nukleinsäure enthaltenden Lösungen.

WO 03/040364

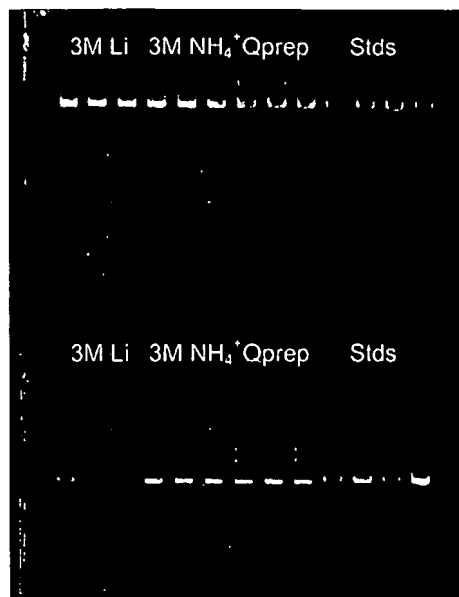
PCT/EP02/12384

1/4

Densitometrische Bestimmung [μ g]:

pCMV β (high-copy):

pBRCMV β (low-copy):

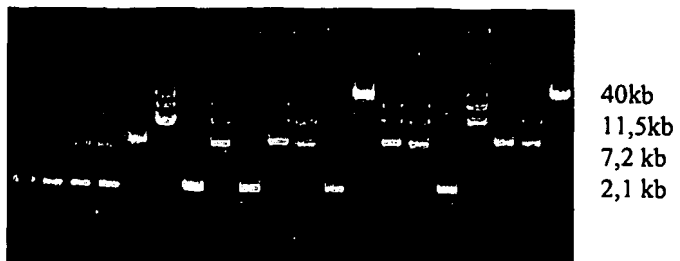


WO 03/040364

PCT/EP02/12384

2/4

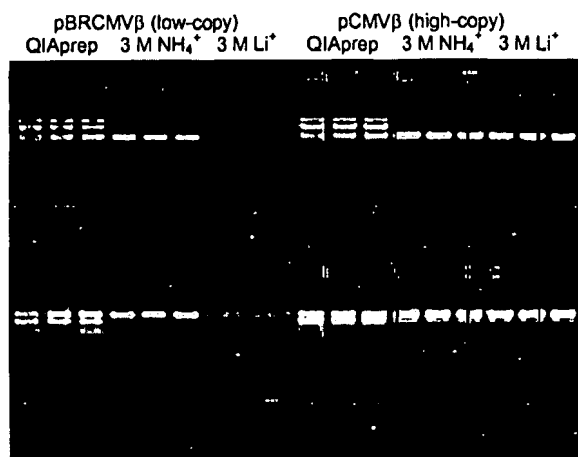
Schnellprep:



WO 03/040364

PCT/EP02/12384

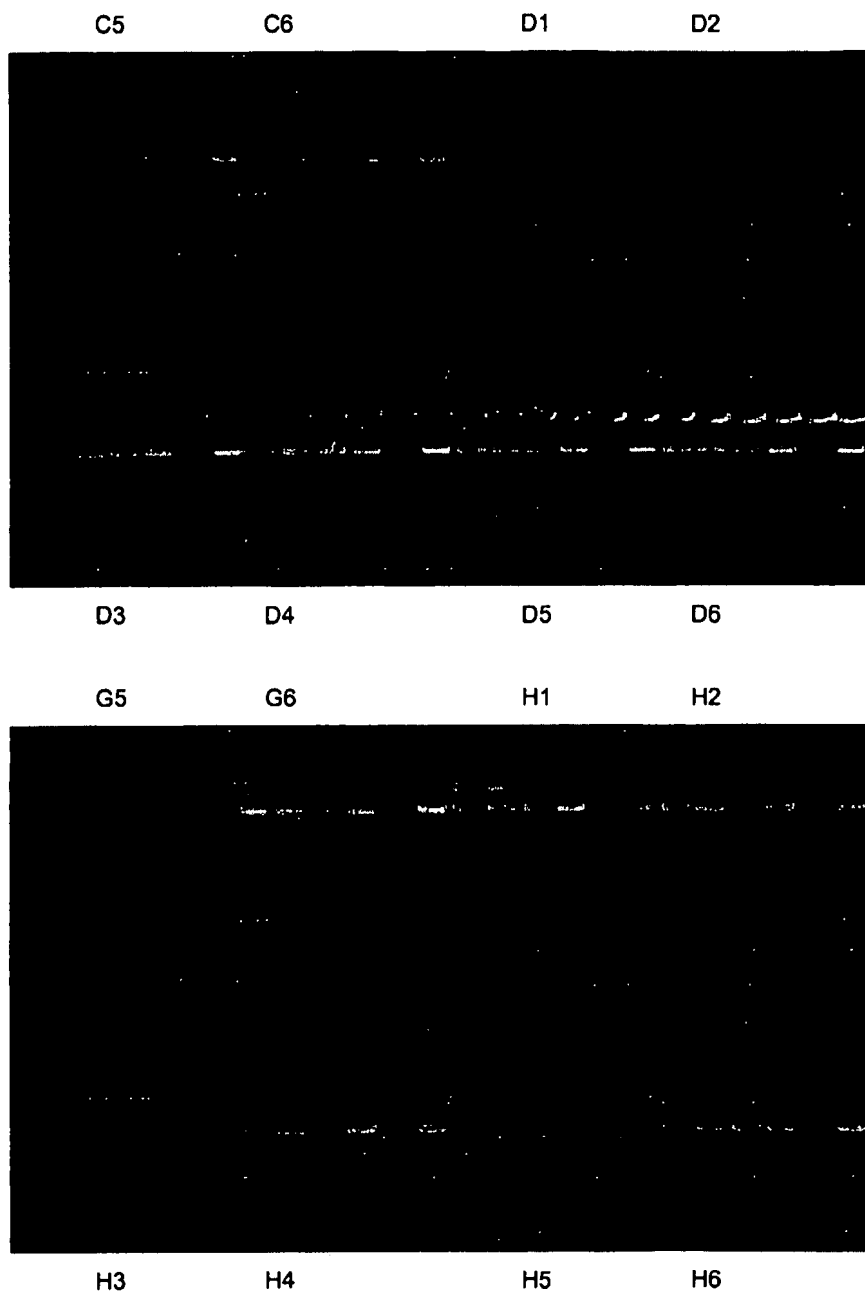
3/4



WO 03/040364

PCT/EP02/12384

4/4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern: plication No
 PCT/EP 02/12384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 03 507 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 10 August 2000 (2000-08-10) the whole document	1-26
X	WO 95 01359 A (BASTIAN HELGE ;QIAGEN GMBH (DE); COLPAN METIN (DE); FEUSER PETRA () 12 January 1995 (1995-01-12) the whole document	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2003

Date of mailing of the international search report

10/02/2003

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bardill, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP 02/12384

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19903507	A	10-08-2000	DE 19903507 A1	10-08-2000
			WO 0044759 A1	03-08-2000
			EP 1165579 A1	02-01-2002
			JP 2002535412 T	22-10-2002
<hr/>				
WO 9501359	A	12-01-1995	DE 4321904 A1	12-01-1995
			AT 200293 T	15-04-2001
			CA 2142910 A1	12-01-1995
			DE 59409712 D1	10-05-2001
			DK 658164 T3	18-06-2001
			WO 9501359 A1	12-01-1995
			EP 0658164 A1	21-06-1995
			ES 2155477 T3	16-05-2001
			JP 8501321 T	13-02-1996
			PT 658164 T	28-09-2001
			US 6383393 B1	07-05-2002
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatl : Aktenzeichen

PCT/EP 02/12384

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 03 507 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 10. August 2000 (2000-08-10) das ganze Dokument ---	1-26
X	WO 95 01359 A (BASTIAN HELGE ;QIAGEN GMBH (DE); COLPAN METIN (DE); FEUSER PETRA () 12. Januar 1995 (1995-01-12) das ganze Dokument -----	1-26



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

g Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Januar 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/02/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-2016

Bevollmächtigter Beauftragter

Bardili, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatio: Aktenzeichen

PCT/EP 02/12384

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19903507 A	10-08-2000	DE 19903507 A1	10-08-2000
		WO 0044759 A1	03-08-2000
		EP 1165579 A1	02-01-2002
		JP 2002535412 T	22-10-2002
WO 9501359 A	12-01-1995	DE 4321904 A1	12-01-1995
		AT 200293 T	15-04-2001
		CA 2142910 A1	12-01-1995
		DE 59409712 D1	10-05-2001
		DK 658164 T3	18-06-2001
		WO 9501359 A1	12-01-1995
		EP 0658164 A1	21-06-1995
		ES 2155477 T3	16-05-2001
		JP 8501321 T	13-02-1996
		PT 658164 T	28-09-2001
		US 6383393 B1	07-05-2002